

日内介入頻度が筋性拘縮に対するベルト電極式 骨格筋電気刺激法の介入効果におよぼす影響

柏尾 光生

本研究の目的は日内介入頻度を2回/日に増やし、不動によって惹起される筋性拘縮に対するベルト電極式骨格筋電気刺激法(B-SES)の効果を先行研究で報告されている日内介入頻度が1回/日の場合と比較することである。7週齢のWistar系雄性ラット21匹を無処置の対照群、両側足関節を2週間不動化する不動群、不動化の過程で2回/日の日内介入頻度でB-SESを実施するB-SES群に振り分けた。なお、B-SESの刺激条件は日内介入頻度以外はすべて先行研究と同様である。結果、B-SES群には足関節背屈可動域制限と腓腹筋の線維化の進行抑制効果が認められ、特に後者は先行研究で報告されている日内介入頻度が1回/日の場合より効果的であった。つまり、筋性拘縮に対するB-SESの効果は日内介入頻度が影響をおよぼすといえる。

はじめに

日本理学療法士協会理学療法白書委員会がまとめている1995～2015年までの理学療法実態調査報告の結果をみると、拘縮が主原因の関節可動域障害は常に治療した患者において問題となった5つの障害の上位にあげられている¹⁻⁵⁾。つまり、理学療法の臨床では拘縮に由来した関節可動域障害の発生頻度が高く、主な対象障害になっているといえる。そして、臨床においては以下のような要因によって拘縮が発生することが多い。具体的には、骨折や靭帯損傷などの運動器の傷害が発生すると疼痛が発生するが、この疼痛をマネジメントできないと、不動環境が強いられ、拘縮の発生・進行につながる。また、運動器の傷害の治癒促進を目的に行われるキャスト固定や創外固定などの不動処置は二次的に拘縮を惹起する。このように、拘縮に由来した関節可動域障害の発生要因には身体局所あるいは全身の不動が深く関わっている⁶⁾。

所属研究室の先行研究⁷⁻⁹⁾によれば、拘縮の発生要因とされる不動が関節周囲軟部組織におよぼす影響が検索されており、特に骨格筋の変化に由来した拘縮、すなわち筋性拘縮に関してはその詳細な検索結果から、発生メカニズムが

明らかになっている。具体的には、骨格筋が不動に曝されると筋核にアポトーシスが生じ、その筋核に制御されていた細胞質の処理のためにマクロファージが集積するといわれている。そして、この事象を発端として炎症性サイトカインの発現ならびに線維化関連分子の賦活化が生じ、コラーゲンの増生、すなわち線維化が惹起され、筋性拘縮が発生するとされている^{9,10)}。つまり、筋性拘縮の発生メカニズムにおける重要事象は筋核のアポトーシスを契機としたマクロファージの集積と考えられている^{9,10)}。したがって、このメカニズムを基盤に考えると、筋核のアポトーシスを抑止できる介入戦略、具体的には不動後早期からの積極的な筋収縮運動の負荷が筋性拘縮を予防する上では重要と思われる。そのため、積極的な筋収縮運動の負荷が実施可能な骨格筋電気刺激(electrical muscle stimulation; 以下、EMS)は有効な介入戦略になると考えられ、特に下肢の多くの骨格筋に対して積極的な筋収縮運動の負荷が実施可能なベルト電極式骨格筋電気刺激法(belt electrode skeletal muscle electrical stimulation; 以下、B-SES)は有効な介入戦略になることが所属研究室の先行研究¹¹⁾で明らかになっている。

所属研究室の先行研究¹¹⁾では、ラット足関節

を底屈位で不動化した実験モデルを用い、2 週間の不動化の過程でラット足関節の最大底屈筋力の 60%が発揮される 4.7mA を刺激強度とし、刺激サイクルは 2 秒収縮、2 秒休止の 1:1、刺激時間は 15 分間で、1 回/日、6 日/週の頻度で、延べ 2 週間の介入が行われている。この結果によれば、不動の過程で B-SES 介入を行うと、足関節背屈可動域制限ならびに腓腹筋の線維化の進行抑制効果が認められており、B-SES 介入は筋性拘縮を予防する効果があることが明らかになっている¹¹⁾。しかし、足関節背屈可動域制限ならびに腓腹筋の線維化のいずれにおいても完全に抑止できておらず、その効果量に関しては大きいものではなく、これは日内介入頻度が 1 回/日と少ないことが影響しているのではないかと思われる。そこで、日内介入頻度を 2 回/日に増やせば筋性拘縮に対する効果量も高まるのではないかと仮説をたてた。

本研究の目的は日内介入頻度を 2 回/日に増やし、不動によって惹起される筋性拘縮に対する B-SES の効果を先行研究¹¹⁾で報告されている日内介入頻度が 1 回/日の場合と比較し、上記の仮説を検証することである。

材料と方法

1. 実験プロトコル

1) 実験動物

本研究における動物実験に関しては、長崎大学が定める動物実験指針ならびに長崎大学動物実験委員会で承認を受けた実験計画書(承認番号; 1903281524)に準じ、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科バイオメディカルモデル動物研究センターで実施した。

実験動物には 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 21 匹(体重; 202~226g, 平均体重; 215.1 ± 6.8g)を使用した。そして、これらのラットを 7 匹ずつ①無処置で通常飼育を行う対照群、②両側足関節を最大底屈位でギプスを用いて 2 週間不動化する不動群、③2 週間の不動化の過程で B-SES による介入を行う B-SES 群に振り分けた。

2) 足関節の不動方法

不動群と B-SES 群の各ラットに対しては 3 種

混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によって麻酔を行い、両側足関節を最大底屈位の状態で前足部から膝関節上部までギプス包帯を用いて 2 週間不動化した。不動化の際の留意点として、足指は浮腫の発生を確認するために露出させ、不動期間中は浮腫の発生やギプスの緩みを防ぐ目的で毎日ギプスの巻替えを行った。また、不動後もラットは前肢にて飼育ケージ内を移動できることから、水と餌は自由摂取とした。

なお、麻酔による成長不良などの影響を考慮し、対照群の各ラットに対しても同頻度で麻酔のみを行った。

3) B-SES の方法

①電極の設置と刺激周波数

B-SES 群の各ラットに対しては 3 種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によって麻酔を行った後、ギプスを外し、腹臥位とした後に両側の大腿近位部と下腿遠位部に B-SES 電極を巻いた。そして、刺激周波数はラット後肢骨格筋に強縮を誘発する目的で 50Hz とした。

②刺激強度

所属研究室の先行研究¹¹⁾によれば、正常ラットの足関節最大底屈筋力の 60%を B-SES で誘発させるためには 4.7 mA の刺激強度が必要であるとされている。そこで、本研究における刺激強度も 4.7 mA とした。

③刺激サイクルと刺激時間

所属研究室の先行研究¹¹⁾では、刺激強度を 4.7 mA とし、2 秒収縮、2 秒休止の 1:1 の刺激サイクルで通電した際の足関節底屈筋力の推移が調査されている。この結果によれば、18 分後から筋疲労による筋出力の低下が認められている。そこで、本研究ではこの結果ならびに今後の臨床適用を考慮し、刺激時間を 15 分に設定した。

④日内介入頻度

所属研究室の先行研究¹¹⁾では、上記の①~③の条件での B-SES 介入を 1 回/日の日内介入頻度で実施し、不動によって惹起されるラット腓腹筋の筋性拘縮に対する効果が検討されている。しかし、前述したように足関節背屈可動域制限ならびに腓腹筋の線維化のいずれにおいても完全に抑止できていない。本研究ではこの先行研究¹¹⁾より日内介入頻度を増やせば、足関節背屈

可動域制限や腓腹筋の線維化の抑止効果も高まるのではないかと仮説し、実験計画した。具体的には、日内介入頻度を2回/日とし、実際の実施の際は1回目の介入から4時間以上のインターバルをあげ、2回目の介入を行うこととした。

なお、以上の刺激条件でのB-SESは6日/週の頻度で、延べ2週間実施した。

2. 検索方法

1) 足関節背屈可動域の測定方法

前述の不動処置を開始する前ならびに2週間の実験期間中は1週毎に以下の方法で足関節背屈可動域を測定した。具体的には、3種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によってラットを麻酔し、側臥位とした後に股・膝関節を他動的に最大屈曲させ、足底部に丸型テンションゲージ(大場製作所)の先端部をあて、0.3Nの張力で足関節を他動的に背屈させた。そして、膝関節裂隙中央部と腓骨外果を結んだ線を基本軸、腓骨外果と第5中足骨を結んだ線を移動軸とし、これらの2つの軸がなす外角を足関節背屈可動域とし、これを5°単位で読み取った。なお、以上の測定は3回行い、その最大値をデータとして採用した。

2) 検索材料

2週間の実験期間終了後は3種混合麻酔薬の腹腔内投与(5mg/kg)によって各ラットを麻酔し、両側の腓腹筋外側頭を採取した。そして、採取した腓腹筋外側頭は以下に述べる組織学的・生化学的検索に供した。

3) 組織学的検索

採取した右側の腓腹筋外側頭は腱に近い遠位端、近位端を切除し、トラガントゴム(ナカライテスク社)に包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結した。そして、クリオスタット(Leica社, CM1950)を用いて7μm厚の連続横断切片を作製し、一部の切片に対してはヘマトキシリン・エオジン(以下、H&E)染色を施し、病理所見の観察を行った。また、一部の切片に対してはピクロシリウスレッド染色を施し、筋周膜や筋内膜を構成するコラーゲンを可視化し、線維化の発生状況を評価した。

4) 生化学的検索

① 試料作製

線維化の指標となるコラーゲン含有量に関しては、以下に述べる生化学的検索によってコラーゲン特有の構成アミノ酸であるヒドロキシプロリン含有量を定量することによって評価した。具体的には、採取した左側の腓腹筋外側頭の一部を細断し、24時間凍結乾燥処理を行い、乾燥重量を測定した。次に、この試料に6N-HClを1ml加え、110°Cで15時間加水分解を行い、塩酸を除去した後、蒸留水1mlを加え、試料を溶解した。そして、0.6μmのフィルターで試料を濾過し、これをヒドロキシプロリン定量用の試料とした。

② ヒドロキシプロリンの定量

試料5μlを2時間、100°Cで加熱処理した後、4N-NaOHを50μl加え、攪拌し、90°Cで2時間再度加熱処理を行った。次に、Chlamine-T溶液を500μl加え、室温で25分間処理した後、Ehrlich溶液を500μl加え、攪拌し、80°Cで20分間加熱処理し、試料を発色させた。そして、波長540nmで試料の吸光度を測定し、ヒドロキシプロリン濃度に基づく標準曲線を基に試料内のヒドロキシプロリンを定量した。なお、定量したヒドロキシプロリンは乾燥重量で除し、単位乾燥重量あたりの含有量として表した。

5) 統計処理

各群のデータは一元配置分散分析とScheffe法による事後検定を適用し、危険率5%未満をもって有意差を判定した。

結果

1) 足関節背屈可動域

不動1週間後では不動群、B-SES群ともに対照群に比べ有意に低値を示し、この2群間を比較するとB-SES群が不動群より有意に低値を示した。一方、不動2週間後では不動群、B-SES群ともに対照群に比べ有意に低値を示すものの、この2群間を比較するとB-SES群が不動群より有意に高値を示した(図1)。

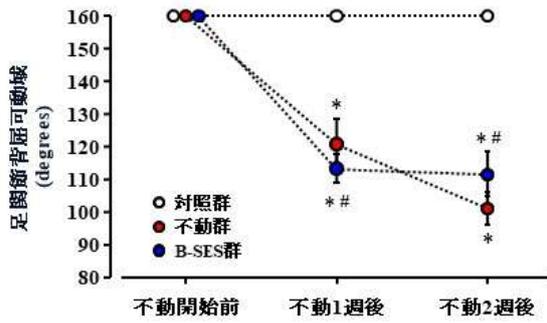


図 1 足関節背屈可動域の推移

*; 対照群との有意差, #; 不動群との有意差を示す.

2) 組織学的検索結果

H&E 染色像を検鏡した結果、不動群と B-SES 群には筋線維サイズの縮小が認められた。しかし、マクロファージの浸潤が認められる筋線維や中心核を有する筋線維などは認められなかった。したがって、不動や B-SES 介入といった実験処置による筋線維損傷の発生はないと判断した。

次に、ピロシリスレッド染色像を検鏡した結果、不動群には筋周膜や筋内膜に肥厚が認められ、コラーゲンの増生に伴う線維化の発生が伺われた。一方、B-SES 群には筋周膜や筋内膜の肥厚は認められず、線維化の発生が抑止されている傾向がみられた(図 2)。

3) 生化学的検索結果

各群のヒドロキシプロリン含有量を比較すると、不動群は対照群に比べ有意に高値を示した。一方、B-SES 群は不動群より有意に低値を示し、対照群との有意差も認められなかった(図 3)。

考察

今回の不動 2 週後の足関節背屈可動域の結果から、B-SES 介入は関節可動域制限の進行を抑制する効果があるといえる。しかし、不動群の足関節背屈可動域に対し B-SES 群のそれは約 10° の増加であり、この効果量を先行研究¹¹⁾で報告されている日内介入頻度が 1 回/日の場合と比較しても大差はなかった。したがって、関節可動域制限に対する B-SES の効果は日内介入頻度の影響は少ないといえる。

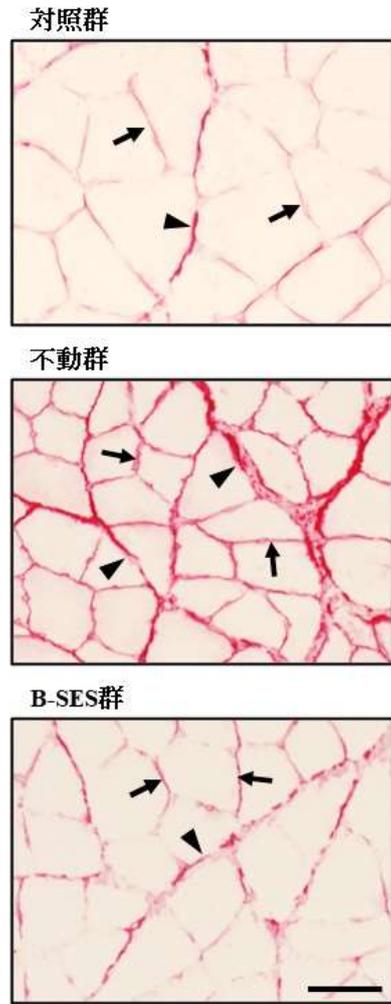


図 2 ピロシリスレッド染色像

矢頭は筋周膜, 矢印は筋内膜であり, スケールバーは 50 μm を示す.

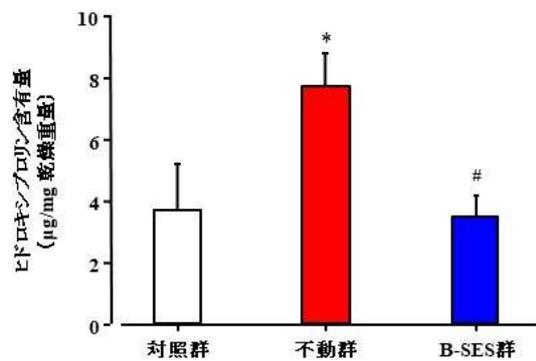


図 3 ヒドロキシプロリン含有量の比較

*; 対照群との有意差, #; 不動群との有意差を示す.

次に、ピクシロウスレッド染色像の検鏡結果では、不動群には筋周膜や筋内膜に肥厚が認められたが、B-SES群にはこれらの所見は認められなかった。そして、ヒドロキシプロリン含有量の結果をみると、不動群は対照群より有意に高値を示すものの、B-SES群は不動群より有意に低値で、対照群との有意差も認められなかった。つまり、これらの結果は不動によって惹起される骨格筋の線維化の発生をB-SES介入によって抑止できることを示唆している。加えて、先行研究¹¹⁾で報告されている日内介入頻度が1回/日の場合におけるヒドロキシプロリン含有量はB-SES群が不動群より有意に低値を示すものの、対照群より有意に高値を示した。つまり、日内介入頻度が1回/日の場合は不動によって惹起される骨格筋の線維化の発生を完全には抑止できないといえ、このことを踏まえると、線維化の発生予防効果は日内介入頻度が2回/日の場合が効果的といえる。そして、骨格筋の線維化が筋性拘縮の主要な病態であることを考慮すると⁹⁾、筋性拘縮に対するB-SESの効果は日内介入頻度が影響をおよぼすといえる。

一方、本研究の限界としては、以下の点あげられる。すなわち、関節可動域制限に対しては日内介入頻度の影響が少なかったが、この要因として、関節可動域制限は今回検索対象としていない皮膚や関節包などといった他の関節周囲軟部組織の変化も関与しており、この点の検索が今後必要と思われる。加えて、線維化の指標として、今回はピクシロウスレッド染色による組織学的検索ならびにヒドロキシプロリン含有量の検索しか行えていない。つまり、線維化の発生に関与している筋核のアポトーシスやマクロファージ、さらには炎症性サイトカインやその他の線維化関連分子の動態^{9),10)}は不明であり、今後はこれらの動態についても検索が必要である。

以上、本研究を総括すると、B-SES介入の日内介入頻度を2回/日に増やすと、骨格筋の線維化の発生を抑止できる可能性が示唆され、筋性拘縮に対する効果量も高くなるといえよう。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導、ご協力いた

だきました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科運動障害リハビリテーション学研究室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 沼田憲治, 伊東 元, 他: 理学療法実態調査報告—1995年4月実施. 理学療法学. 1995; 22: 222-252, .
- 2) 沼田憲治, 板垣文則, 他: 理学療法士実態調査報告—2000年4月実施. 理学療法学. 2000; 27: 253-267.
- 3) 沼田憲治, 金 承革, 他: 理学療法士実態調査報告—2005年6月実施. 理学療法学. 2006; 33: 338-352.
- 4) 仙波浩幸, 青木菜摘, 他: 理学療法士実態調査報告—2010年1月実施. 理学療法学. 2010; 37: 188-217.
- 5) 理学療法白書2016(第2部資料編, 第2節アンケート調査内容(2015年度実施)), (公社)日本理学療法士協会, 東京, 2016, pp56-83)
- 6) 沖田 実: 総論, 運動器の傷害と機能障害—その病態とメカニズム. 沖田 実, 坂本淳哉(編), 三輪書店, 東京, 2021, pp.3-19.
- 7) Goto K, Sakamoto J, et al.: Development and progression of immobilization-induced skin fibrosis through overexpression of transforming growth factor- β 1 and hypoxic conditions in a rat knee joint contracture model. Connect Tissue Res. 2017; 58: 586-596.
- 8) Sasabe R, Sakamoto J, et al.: Effects of joint immobilization on changes in myofibroblasts and collagen in the rat knee contracture model. J Orthop Res. 2017; 35: 1998-2006.
- 9) Honda Y, Sakamoto J, et al.: Upregulation of interleukin-1 β / transforming growth factor- β 1 and hypoxia relate to molecular mechanisms underlying immobilization-induced muscle contracture. Muscle Nerve. 2015; 52: 419-427.

- 10) Tanaka N, Honda Y, et al.: Myonuclear apoptosis via cleaved caspase-3 upregulation is related to macrophage accumulation underlying immobilization-induced muscle fibrosis. *Muscle Nerve*. 2022; 65: 341-349.
- 11) Honda Y, Takahashi A, et al.: Muscle contractile exercise through a belt electrode device prevents myofiber atrophy, muscle contracture, and muscular pain in immobilized rat gastrocnemius muscle. *PLoS One*. 2022; 17: e0275175.

(指導教員: 沖田 実)